

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. Thomas Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VERSUCH DES NACHWEISES VON KI 67-MESSENGER-RNA IN DER
GAUMENMANDEL MITTELS *IN SITU*-REVERSE TRANSKRIPTASE-
POLYMERASE KETTEN REAKTION**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

MATTHIAS KALBE

aus Kingston, Kanada

Kiel
2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J.-M. Schröder

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Caliebe

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 11.04.2017

gez. Prof. Dr. J. Roider
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Diese Arbeit möchte ich meinen Eltern widmen.

1. Einleitung	1
1.1 <i>In Situ</i> -Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion	1
1.2 Das Ki-67-Antigen	3
1.3 Aufgabe	4
2. Material und Methoden	6
2.1 Materialien	6
2.1.1 Substanzen	6
2.1.2 Gewebeproben	7
2.1.3 Oligonukleotide	7
2.1.4 Enzyme, Antikörper, Kits	8
2.1.5 Geräte	8
2.2 Methoden	9
2.2.1 Probengewinnung	9
2.2.2 Gewinnung der RNA	9
2.2.3 Reverse Transkriptase	10
2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion	11
2.2.5 Elektrophorese	13
2.2.6 Herstellung einer DNA-Sonde	14
2.2.7 Elektroblot-Methode	15
2.2.8 Vorbereitung der histologischen Schnitte	15
2.2.9 <i>In Situ</i> -RT-PCR	16
2.2.10 <i>In Situ</i> -RT-PCR mit rTth-Polymerase	17
2.2.11 Hybridisierung mit der Sonde	18
2.2.12 Primed <i>In Situ</i> Labeling (PRINS)	19
2.2.13 Detektion	19
2.2.14 Zusammenfassende Bemerkung, Variationen	20
3. Ergebnisse	23
3.1 Nachweis von mRNA	23
3.2 Nachweis mittels DNA-Sonde	24
3.3 Primer mit selbstkomplementären 5'-Adapttern	25
3.4 <i>In Situ</i> -RT-PCR	25
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	35
6. Literaturverzeichnis	36
7. Danksagung	42
8. Lebenslauf	43

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BP	Basenpaar
CDP	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat
cDNA	Copy-DNA
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GIT	Guanin-Iso-Thiocyanat
IS	<i>In Situ</i>
ISH	<i>In Situ</i> Hybridisierung
MET	2-Mercapto-Ethanol
mRNA	Messenger-RNA
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NTP	Nukleosid Triphosphat
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PRINS	Primed In Situ Labeling
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered-saline
U	Unit

1. Einleitung

1.1 *In Situ*-Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist in den meisten Organismen dieser Erde der Träger von Erbinformationen. Sie befindet sich bei Eukaryonten im Zellkern und dient als Matrize bei der semikonservativen Replikation vor der Zellteilung und für die Herstellung von Ribonucleinsäure (Transkription). Die Ribonucleinsäure (RNA) wiederum dient unter anderem der Proteinsynthese im Zelleib (Translation) und bestimmt die Aminosäuresequenz des Proteins [1,2]. Vereinfachend lässt sich also zusammenfassen, dass ein bestimmtes Ribonukleinsäure-Molekül, sogenannte Messenger-RNA, die Abschrift eines bestimmten DNA-Abschnittes ist, die außerhalb des Zellkerns als Bauplan für ein Protein dient.

Die Polymerase-Kettenreaktion (aus dem Englischen: polymerase chain reaction, kurz: PCR) ist heutzutage in der biowissenschaftlichen Welt eine der wichtigsten molekularbiologischen Nachweismethoden. Dieses von Mullis 1983/84 vorgestellte Verfahren, welches aus einer Abwandlung der Didesoxy-Sequenzanalyse von Sanger entwickelt wurde, ermöglicht es, spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Nur geringste Mengen DNA können, ähnlich, wie auf natürliche Weise im Zellkern, exponentiell vermehrt (=amplifiziert) werden. Hierzu wird die DNA-Doppelhelix zunächst durch Erhitzen in zwei gegensätzliche Einzelstränge aufgeteilt. Wenn kurzstreckige DNA-Moleküle (sogenannte Starter oder Primer) hinzugefügt werden, binden diese sich temperaturabhängig an bestimmte komplementäre Regionen eines DNA-Einzelstranges. An diesen Verbindungsstellen kann ein zur DNA-Synthese bestimmtes hitzestabiles Enzym (eine DNA-Polymerase) binden und beginnt mit der Synthese eines neuen komplementären Stranges. Benötigt werden hierzu unter anderem die vier aktivierten Vorstufen der DNA-Bausteine (die Desoxyribonucleosidtriphosphate). Das Reaktionsgemisch muss wiederkehrend (zyklisch) festgelegten Temperaturen unterliegen, so dass sich die Einzelschritte der Polymerase-Kettenreaktion wiederholen und die ursprüngliche DNA exponentiell vermehrt werden kann [3,4].

In den 1990er Jahren wurden Verfahren der PCR an intakten Zellen [5] und an Gewebeschnitten, insbesondere an mit Formalin fixiertem und in Paraffin

eingebettetem Material mit anschließendem Nachweis durch eine markierte DNA- oder RNA-Sonde [6,7,8,9] beschrieben, der sogenannten *In Situ*-PCR. Weitere Entwicklungen waren der Nachweis von RNA-Molekülen durch Synthese der DNA-Kopie (cDNA) von einer RNA-Sequenz mittels viraler RNA-abhängiger DNA-Polymerase oder kurz: Reverse Transkriptase, und anschließender (*In Situ*-) PCR. Die Kombination der beiden letztgenannten Nachweisverfahren wurde *In Situ*-Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion, oder kurz *In Situ*-RT-PCR bzw. IS-RT-PCR bezeichnet [10,11,12,13,14,15]. Es konnte somit RNA im Gewebe dargestellt werden.

Spezifische, amplifizierte Nukleotidsequenzen, z.B. Virus- oder Tumor-spezifisches Genom, aber auch mRNA-Moleküle, die spezifische Proteine translatieren, konnten somit vornehmlich lichtmikroskopisch ihrer Lokalisation im Gewebeverband zugeordnet werden. Auf die Entwicklung verschiedener Variationen von letztgenannten Nachweisverfahren und Techniken soll hier im Einzelnen nicht eingegangen werden. Erwähnenswert ist allerdings der Unterschied zwischen der direkten und der indirekten *In Situ*-PCR. Bei der direkten *In Situ*-PCR werden markierte Nukleosidtriphosphosphate oder Primer ohne Zwischenschritte zur Markierung der Zielsequenzen verwandt. Bei der indirekten *In Situ*-PCR erfolgt nach der Synthese von unmarkierten cDNA-Fragmenten die Markierung mittels *In Situ* Hybridisierung oder vergleichbarer Verfahren (PRINS, siehe Kapitel 2.2.12), [10,11]. Letztere wird im Rahmen dieser Arbeit verwandt.

Mit dieser neuen Methode war es möglich, die sehr sensitive PCR mit der hochspezifischen *In Situ* Hybridisierung (kurz ISH) zu kombinieren, sodass im Gegensatz zur herkömmlichen ISH schon sehr kleine Mengen von bestimmten Nukleotidsequenzen im histologischen Präparat nachweisbar waren [10,11,12,14,15,16,17].

Ferner schien ein hoch sensibler Ersatz zum Gebrauch von ISH mit Radioisotopen geschaffen worden zu sein, welche gesundheitsgefährdenden Abfall verursachte, bürokratisch aufwendiger und teurer war [11].

Allerdings wurde dieses Nachweisverfahren auch als komplex und fehleranfällig beschrieben und wiederkehrend Protokolloptimierung sowie Fehlerelimination zur

Verbesserung der Prozesse empfohlen. So führt Lewis 2001 bereits in einer Aufzählung möglicher diagnostischer Schritte an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe die *In Situ*-RT-PCR als eine der letzten Methoden an und schränkt den allgemeinen Wert folgendermaßen ein: „This method, however, is difficult to perform reliably and reproducibly and remains exclusive to the laboratories that have developed the techniques.“ [18]

1.2 Das Ki-67-Antigen

Das Proliferations-assoziierte Ki-67-Antigen wurde 1983 von Gerdes und Kollegen beschrieben, nach dem es mit dem monoklonalen Maus-Antikörper Ki-67 in proliferierenden, nicht aber ruhenden menschlichen Zellen nachgewiesen werden konnte. Das Ausmaß der Markierung dieses Antigens wurde in der Histopathologie zur Einschätzung der Wachstumsfraktion im Gewebe oder zur Bemessung der Proliferation in Tumor-Proben betrachtet. 1991 konnte nachgewiesen werden, dass das Antigen zwei unterschiedlich großen Polypeptiden entsprach. Weiter wurden der mRNA dieser Peptide entsprechende cDNA-Klone aus dem Genom der humanen multiplen Myelom-Zelllinie IM-9 isoliert [19,20].

1993 wurde von Schlüter, Duchrow und Kollegen seine Aminosäuresequenz dargestellt, nachdem cDNA der kompletten Ki-67-Antigen determinierenden mRNA gewonnen und geklont werden konnte. Ferner wurde seine wachstumsspezifische Funktion verifiziert [21].

Zum spezifischen Nachweis von dem postulierten Polypeptid als Ki-67-Antigen wurden bestimmte Genabschnitte bakteriell und synthetisch translatiert und nun Antikörper gegen die entsprechenden Peptide hergestellt. Weiter wurde unter Verwendung des Ki-67-Antikörpers sowie der beiden neuen Antikörper entsprechendes Antigen immunhistochemisch auf gefrorenen Tonsillenschnitten nachgewiesen. Alle drei Antikörper zeigten eine identische halbmondförmige Anfärbung in den Reaktionszentren der Tonsillenfollikel [21,22,23], (Abb. 1).

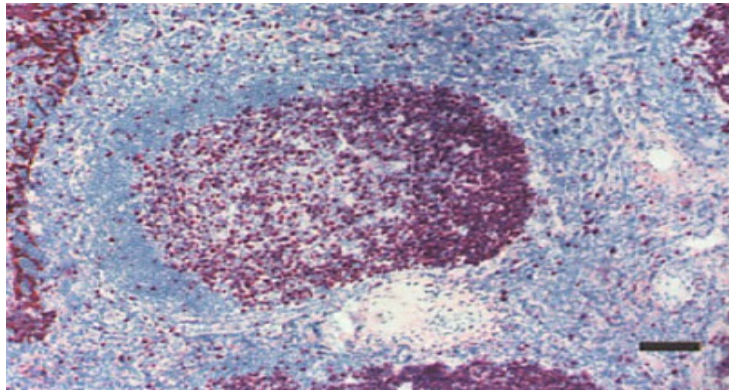


Abbildung 1: Tonsille, Cryo-Schnitt; Immunhistochemischer Nachweis von Ki-67, es zeigt sich ein Halbmond-förmiger Bereich im Reaktionszentrum. Abbildung aus Schlüter, Duchrow et al. (1993): The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins [20].

In der pathologischen Routinediagnostik ist der Nachweis des Ki-67-Antigens heutzutage weiterhin von sehr hohem Wert, wobei mittlerweile zum Antigen-Nachweis die Antikörper MIB-1 oder KiS 5 vermehrt zur Anwendung kommen [24,25,26].

1.3 Aufgabe

Aufgabe dieser Arbeit sollte es sein, mittels *In Situ*-RT-PCR zytoplasmatische mRNA des Ki-67-Antigens an Tonsillen nachzuweisen. Im Gegensatz zu Cryo-Gewebe-Schnitten sollte mit in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Material gearbeitet werden, welches in der mikroskopischen Diagnostik breitere Verwendung findet. Ferner sollten zwei unterschiedliche Thermocycler (zur *In Situ*-RT-PCR konzipierte Geräte, die das Reaktionsgemisch auf dem histologischen Schnitt einem Temperaturprofil mit definierten Zeiten, Temperaturen und zyklischen Wiederholungen aussetzen) zum Einsatz kommen, deren Bedienbarkeit beurteilt und in Hinblick auf die Versuchsergebnisse bewertet werden.

Der Nachweis spezifischer mRNA-Abschnitte gelang in dieser Arbeit nur unter Verwendung einer konventionellen (*In Vitro*-)RT-PCR von Extrakten aus Formalin-fixiertem, paraffinisiertem Gewebe. Versuche, mRNA *in situ* darzustellen, zeigten auch nach Anwendung multipler Variationen und Prozessoptimierungen zu keinem Zeitpunkt die bekannte halbmondförmige Signalverstärkung in den Reaktionszentren der Tonsillenfollikel.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit ist die Interpretation der Einzelergebnisse, Diskussion von möglichen Fehlerquellen und letztlich ein Versuch, die Wertigkeit dieser Untersuchungsmethode in der Forschung und medizinischen Routinediagnostik zu beurteilen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen

Phosphat-gepuffertes 4% Formalin, PBS (Phosphate-Buffered-Saline Solution 0,1M, pH 7,4), Formaldehyd (Merck, Darmstadt)
Xylol (Sigma, Steinheim)
Ethanol absolut (Merck, Darmstadt)
Proteinase K (Boehringer, Mannheim)
Guanidin-Iso-Thiocyanat, GIT (Sigma, St. Louis)
2-Mercapto-Ethanol, MET (Sigma, St. Louis)
N-Lauroyl-Sarcosin, Sarkosyl (Sigma, St. Louis)
Tris-HCl (U.S. Biochemical Corp., Cleveland)
Phenol (Armesco, Solon)
Chloroform, 99% (Sigma, Steinheim)
Glycogen (Boehringer, Mannheim)
Isopropanol, 99% (Sigma, Steinheim)
Agarose (Bio Products, Maine)
Tris-Acetat (Merck, Darmstadt)
TAE-EDTA (U.S. Biochemical Corp., Cleveland)
Ethidiumbromid (Sigma, St. Louis)
Glycerin (U.S. Biochemical Corp., Cleveland)
Bromphenolblau (Sigma, St. Louis)
Tricin (Sigma, St. Louis)
Pepsin (Sigma, Steinheim)
CDP (Boehringer, Mannheim)
TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL; pH 7,5)
NBT/BCIP (Boehringer, Mannheim)
RNase-Inhibitor, RNasin (Promega, Madison)
Kaiser's Glyceringelatine

2.1.2 Gewebeproben

Es wurden anonymisiert Gaumenmandeln (Tonsillae palatinae), die im Rahmen regulärer Tonsillektomien bei drei Schulkindern entnommen und unmittelbar anschließend formalinfixiert wurden, verwandt [27]. Zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Arbeit war die Konsultation und das Einholen einer Genehmigung der Ethikkommission vor der Verwendung humanen Gewebes in der Forschung noch nicht vorgesehen, so dass eine Genehmigung der Ethikkommission nicht existiert.

2.1.3 Oligonukleotide

Als Primer für die PCR wurden Oligonukleotide, die auf individuelle Bestellung von Pharmacia Biotech, Roosendaal hergestellt wurden, verwandt. Zu nennen sind hier mit entsprechender Sequenz vom 5' zum 3'-Ende:

- RACE PCR 3: ATTACAAGACTCGGTCCCTG (upstream)
- RACE PCR 5: TGAAGACCTCCCCAGAGATGG (upstream)
- RACE PCR 8 reverse: CCTCTTGACACTCCGCGTTA (downstream)

Diese Primer sind passend bzw. komplementär zu verbundenen Exon-Sequenzen des Proliferationsgens Ki 67. Das heißt auch: die zu amplifizierenden cDNA-Abschnitte überspringen sogenannte Introns, also primär von genomischer DNA transkribierte Abschnitte, welche aus der mRNA herausgetrennt werden, bevor sie aus dem Zellkern geschleust werden (Spleißen) [1,2]. Entsprechend der Sequenz der mRNA befinden sie sich in Position 9430-9450 (RACE PCR 3), 9570-9590 (RACE PCR 5) und 9880-9860 (RACE PCR 8 reverse). PCR-Produkte mit den Primer-Kombinationen RACE PCR 3 und RACE PCR 8 reverse sind 450 Basenpaare (BP), mit RACE PCR 5 und RACE PCR 8 reverse 310 BP groß [19]. Weitere Primer und Primer-Kombinationen fanden in der konventionellen RT-PCR Anwendung, werden hier jedoch nicht näher erwähnt, da sie keine reproduzierbaren, Amplifikate ergaben.

Die oben genannten Primer wurden mit 5'-Adaptoren der Sequenzen CCCCAAACCCCAAACCCC bzw. GGGGTTTGGGGTTTGGGG, also selbstkomplementären sogenannten „tandem repeat“-Adaptoren, versehen. Die

Amplifikationsprodukte dieser Primer neigen durch ihre komplementären 5'-Enden zur Vernetzung, so dass ein als Konkatermer bezeichnetes hochmolekulares PCR-Endprodukt entsteht.

Ferner Oligo dT (20µM) von GibcoBRL

2.1.4 Enzyme, Antikörper, Kits

Polymerasen, PCR-Reagenzien und entsprechende Kits von Perkin-Elmer:

- rTth DNA Polymerase (2,5U/µl) und Puffer Kit
- Taq-Stoffelfragment (5U/µl), Stoffelpuffer, etc.

Von GibcoBRL:

- Taq DNA Polymerase (5U/µl) und Puffer Kit
- RNase H Reverse Transcriptase (200U/µl) und Puffer Kit

Von Schleicher & Schuell

- Turboblotter Blotting Stack Assembly nebst Nitrozellulosemembran

Ferner:

- RNasin, Ribonuclease Inhibitor (20-40U/µl) von Promega;
- Qiaex Gel Extraction Kit von Qiagen;
- dNTP, Dig-labeled dNTP (je 10mM), AP-gelabeltes Anti-Dig-Fab-Fragment (150mU/ml) und Dig Wash and Block-Puffer Set von Boehringer Mannheim;
- 100-Basenpaar-DNA-Leiter von Gibco.

2.1.5 Geräte

Neben den üblich erforderlichen Laborgerätschaften, zu nennen sind Eppendorf Caps, Pipetten, sterile, filterbewehrte Pipettenspitzen, Zentrifuge, Vakuum-Zentrifuge (Speed Vac), konventioneller PCR-Thermocycler, Elektrophorese-Bad, UV-Licht, Sofortbild- bzw. Digitalkamera, Stratalinker und Elektrobloetter und schließlich Färbepäder für Objektträger, sollen hier gesondert erwähnt werden:

- Perkin-Elmer Gene Amp *In Situ* System 1000, Thermocycler mit Zusatzmaterialien
- MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200, Thermocycler mit Twin Tower Block und Zusatzmaterialien nebst sog. Self-Seal-Reagent.

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Die Tonsillen wurden bereits im OP-Saal in 4% Formalin-PBS-Lösung (Formaldehyd, Merck Darmstadt, Deutschland; Phosphate-Buffered-Saline Solution 0,1 M, pH 7,4) fixiert und über Nacht bei 4°C gelagert, dann mit einem sterilen Skalpell in ca. 4mm große Würfel geschnitten, nach üblicher Weise für histologische Schnitte dehydriert und in Paraffin eingebettet, im Weiteren mit unbenutzter Mikrotomklinge auf etwa 5µm Schnittdicke gebracht und zu gleichen Teilen auf silanisierte Glasobjektträger (Perkin Elmer, Norwalk, USA) aufgetragen, sowie in Eppendorf Caps asserviert [27]. Die Silanisierung dient dazu, durch eine positive Ladung der Glasoberfläche die negativ geladenen Gewebekomponenten elektrostatisch zu binden und so eine bessere Haftung zu erzielen. Die Objektträger wurden dann für 6h auf 60°C erhitzt und anschließend dreimal für je 10min in reinem Xylol entparaffinisiert. Die Gewebeschnitte in Eppendorf Caps wurden zur mRNA-Gewinnung genutzt.

2.2.2 Gewinnung der RNA

Eine modifizierte Methode nach Tyrell et al. [28] bzw. Santer und Schneider [29] fand hier Anwendung. Hierzu wurden drei Schnitte in ein Cap gebracht (s.o.) und für 10min bei 55°C getrocknet, dann mit 500µl reinem Xylol (Sigma, Steinheim, Deutschland) versetzt und 10min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5min bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Vorgang einmal wiederholt. Nun wurde der randständige Rest, respektive das verbleibende Pellet zweimal mit 500µl reinem, unvergälltem Alkohol (Ethanol absolut; Merck, Darmstadt, Deutschland) gemischt und je für 5min bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend jeweils verworfen, das verbleibende Pellet weiter unter Vakuum bei 45°C für 10min getrocknet (Speed Vac). Zur proteolytischen Vorbereitung des Gewebes, dem sogenannten Andau wurde nun 1ml Lösung mit 6mg/ml Proteinase K, ferner 1M GIT, 25mM MET, 0,5% Sarkosyl und 20mM Tris-HCl, pH 7,4 hinzugegeben und für 6h auf 45°C erwärmt. Schließlich wurden reines Phenol und Chloroform 99% im Volumenverhältnis 7 zu 3 frisch gemischt, davon sofort 200µl zur Andau-Lösung dazu gegeben und das Gemisch dann für 10min bei 14000 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig in ein frisches 1,5ml-Cap überführt, mit 2µg Glykogen und 200µl reinem

Isopropanol 99% vermischt und über Nacht bei -70°C ausgefällt.

Im Folgenden wurde das Röhrchen für 30 min bei 20800 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, 700µl 70%iges Ethanol hinzugegeben und erneut 10 min bei 20800 x g zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das verbleibende Pellet in 20µl DEPC-Aqua bidest, also mit Diethyl-Pyrocbonat vorbehandeltem und damit RNase-freiem Wasser aufgelöst. Die so entstandene mRNA-Probe wurde abschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3 Reverse Transkriptase

Hierbei sollte eine komplementäre DNA-Kopie (cDNA) der extrahierten mRNA erstellt werden, da bei der Polymerase-Kettenreaktion DNA, jedoch keine RNA amplifiziert werden kann. Zu diesem Zweck wurden 10µl der mRNA-Probe mit 1µl Oligo-dT-Gemisch (0,5g/ml), also einem Desoxythymidin-Oligonucleotid, welches an Poly-A-Regionen (sog. Poly-A-Schwanz) der mRNA in Bindung geht, als unspezifischem Primer versetzt, gemischt, kurz in der Zentrifuge an-zentrifugiert, für 10min bei 70°C inkubiert, um ein Annealing, also eine Verbindung der Matrize mit dem Primer, zu ermöglichen und anschließend sofort auf Eis gelegt. Im Folgenden wurde das Reaktionsgemisch unter Zuhilfenahme des Reverse Transkriptase Kits RNase H Reverse Transcriptase (200U/µl) mit Puffer und Dithiothreitol, dem Ribonuklease Inhibitor RNasin und Desoxyribonucleosidtriphosphat-Gemisch dNTPs komplettiert (Tabelle 1).

mRNA-Probe	10µl
Primer, Oligo-dT	1µl
RNase-Inhibitor RNasin	1µl
DTT 0,1M	2µl
RT-Puffer (5x First Strand Buffer)	4µl
dNTPs 10mM	1µl
Reverse Transkriptase	1µl
Reaktionsgemisch	20µl

Tabelle 1: Reaktionsgemisch für die Reverse Transkriptase-Reaktion

Anzumerken bleibt, dass mit RNAsin ein Inhibitor ribosomaler RNAsen hinzugefügt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 60min mit 42°C, dann 5min mit 90°C inkubiert, anschließend 30µl mit Diethylpyrocarbonat vorbehandeltes und damit von RNase-Aktivität befreites, destilliertes Wasser (DEPC-Bidest) addiert; es resultierten 50µl Vorlage zur Amplifikation (sog. Template) für die folgenden Polymerase-Kettenreaktionen.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Von unterschiedlichen Variationen führten die Primer für einen Intron-überspannenden Sequenzabschnitt mit 310 (RACE PCR 5-8 reverse) bzw. 450 (RACE PCR 3-8 reverse) BP zu den besten *In Vitro*-Ergebnissen.

Das PCR-Reaktionsgemisch (Tabelle 2) wurde mit dem Produkt der Reversen Transkriptase-Reaktion wie in 2.2.3 erläutert als Template zusammengestellt, zusätzliche Bestandteile waren die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase (Taq DNA Polymerase) und ein vom Hersteller mitgelieferter PCR- bzw. Tricin-Puffer.

Template (s.o.)	10µl
Tricin-Puffer	5µl
Primer 20µM (RACE PCR 3 bzw. 5)	2,5µl
Primer 20µM (RACE PCR 8 reverse)	2,5µl
dNTPs 10mM	2µl
DEPC-Bidest	28µl
Reaktionsgemisch	50µl

Tabelle 2: Zusammenstellung des PCR-Reaktionsgemisches

Das Eppendorf-Cap wurde gegen Verdunstung mit 80µl Öl überschichtet. Anschließend wurde bei 93°C 0,5µl Taq DNA Polymerase zugeführt (sogenannter „hot start“, um unspezifische Primer-Template-Bindung zu verhindern). Nachfolgend im Thermoblock wurde folgendes Temperaturprofil ausgewählt, wobei im Kern wiederkehrend die kurze Denaturierung, also Lösung der Doppelhelix bei 94° C, die Primeranlagerung (sog. Annealing, 70 und 55°C) und die Kettenverlängerung (72°C),

also die Polymerase-Synthese ermöglicht werden sollen. Das Temperaturprofil ist in Tabelle 3 dargestellt.

	Temperaturprofil	
94°C	2min	
94°C	1min	
70°C	1min/-1°C pro Zyklus	
72°C	2min	8mal
94°C	1min	
55°C	1min	
72°C	2min/+2sec pro Zyklus	30mal
72°C	5min	
4°C	Ende	

Tabelle 3: Temperaturprofil der PCR

Angemerkt werden muss, dass bei der zunächst hohen, dann abnehmenden Annealing-Temperatur unspezifische Verbindungen der Primer mit dem Template verhindert werden sollten (sog. touch down PCR). Die Verlängerung der Synthese- bzw. Elongationszeit sollte die suffiziente Polymerase-Kettenreaktion trotz zunehmender Konzentration fertiger Amplifikate und abnehmender Konzentration der Desoxyribonucleosidtriphosphate ermöglichen. Abschließend sollte eine lange Kettenverlängerungsphase den Verbrauch von Substratüberschuß ermöglichen und schließlich die Kühlung auf 4°C das Amplifikat für die folgenden Schritte konservieren.

„Boost“-PCR

Aus der PCR hervorgegangene Amplifikate wurden als Template (10 µl) in einer erneuten konventionellen PCR wie oben beschriebenen genutzt.

Primer mit selbstkomplementären „tandem repeats“

Im Weiteren wurden die o.g. Schritte mit äußeren Primern mit einem selbstkomplementären 5'-Adapter, sonst aber identischen Sequenzen, durchgeführt (s. 2.1.3). Die Vernetzung der 5'-Enden sollte die Bildung eines großen Moleküls, welches weniger wahrscheinlich bei den post-PCR-Schritten aus dem Zytoplasma gespült wird, ermöglichen [30]. Die Annealingtemperatur wurde von 55 auf 58°C geändert und 40 Zyklen 94°C/1min; 58°C/1min und 72°C/2min+2sec pro Zyklus gefahren, schließlich für 15min bei 72°C zur Kettenverlängerung gehalten und auf 4°C gekühlt. In Tabelle 4 ist das Temperaturprofil dargestellt.

Temperaturprofil		
94°C	2min	
94°C	1min	
60°C	1min	
72°C	2min	40mal
94°C	1min	
58°C	1min30sec	
72°C	2min	20mal
4°C	Ende	

Tabelle 4: PCR-Temperaturprofil für Primer mit selbstkomplementärem 5'-Adapter

2.2.5 Elektrophorese

Für das Gel wurden 1g Agarose mit 4,5µl Ethidiumbromid in 50ml TAE gelöst, in einem Mikrowellenofen mit 600W für 30sec erhitzt und zu einer Gelplatte gegossen. Nach dem Abkühlen der Gelplatte wurde dann im Wasserbad bei 90V Gleichstrom 9µl Reaktionsgemisch plus 1µl Auftragspuffer (bestehend aus Glycerin und Bromphenolblau) neben einer 100-BP-Leiter aufgetragen, die als Maßstab zur Größenbestimmung des Amplifikats diente, und schließlich unter UV-Licht abgelichtet [2,31].

2.2.6 Herstellung einer DNA-Sonde

PCR-Produkte sollten mittels einer Sonde detektiert werden. Hierzu wurde eine mit Digoxigenin markierte (engl. labeled) Sonde hergestellt. Als Template diente eine cDNA-Lösung von mRNA der human-multiple-myeloma Zelllinie (IM-9, 0,05µg/ml); dem Reaktionsgemisch wurden statt der zuvor verwandten Desoxyribonucleosidtriphosphaten mit Digoxigenin markierte (Dig-labeled dNTP) zugeführt (Tabelle 5).

Template	10µl
Primer 20µM (RACE PCR 5)	4µl
Primer 0,5µM (RACE PCR 8 reverse)	3,2µl
Tricin-Puffer	10µl
Dig-labeling-Mix (10mM)	10µl
DEPC-Bidest	62,3µl
Reaktionsgemisch	99,5µl

Tabelle 5: Reaktionsgemisch zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Dem Reaktionsgemisch wurden nach Überschichtung mit 80µl Öl 0,5µl Taq-Polymerase bei 93°C zugefügt. Das Temperaturprofil wurde wie folgt gewählt (Tabelle 6).

	Temperaturprofil	
94°C	5min	
85°C	1min	
94°C	2min (Taq-Polymerase hinzugegeben)	
55°C	2min	
72°C	3min/+2sec pro Zyklus	35mal
72°C	15min	
4°C	Ende	

Tabelle 6: PCR-Temperaturprofil zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Das komplette Endprodukt wurde zur Elektrophorese aufgetragen und die entsprechenden Banden nach Auftrennung mit dem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt. Zwei breite Banden stellten sich bei etwa 900 und 1.000 BP der 100-BP-Leiter dar (einsträngige Moleküle, mutmaßlich wesentlich kleiner). Die Weiterverarbeitung erfolgte entsprechend dem Manual mittels Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, Germantown, USA). Dabei wurde das DNA-Gemisch aus dem Agarosegel gelöst, unter hoher Salzkonzentration an Siliziumdioxid-Gelpartikel adsorbiert und in geringer konzentrierter Salzlösung wieder gelöst.

2.2.7 Elektroblot-Methode

Mittels Southern-Blotting-Methode [32] wurden RT-PCR-Endprodukte wie in 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben vom Agarose Gel mittels Elektroblot auf eine Nylon-Membran aufgetragen, die Digoxigenin-markierte Sonde entsprechend der Hersteller-Empfehlungen des Dig Wash- und Blocker-Kits hybridisiert und schließlich der Chemilumineszenz-Nachweis mit CDP (2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat) über Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragment durchgeführt und auf regulären Röntgenfilm übertragen. Prinzipiell wurde also auf die Nylon-Membran übertragene cDNA denaturiert und die Sonde zur Hybridisierung zugefügt, das dort gebundene Digoxigenin mittels Antikörper-Fab-Fragment detektiert und die hiermit konjugierte Alkalische Phosphatase mit einem chemilumineszenten Substrat versehen. Die Nylonmembran wurde auf eine unbelichtete Röntgen-Folie gebracht und anschließend entwickelt. Die Verteilung der cDNA konnte so indirekt mit belichteten Arealen auf dem Röntgen-Film dargestellt werden.

2.2.8 Vorbereitung der histologischen Schnitte

Die Vorbereitung der Gewebeschnitte und weitere *In-Situ*-Arbeitsmethoden erfolgten modifiziert nach Peters und Kollegen [33,34] und Komminoth und Long [6]. Frische Schnitte von etwa 5µm Schichtdicke wurden auf spezielle für *In Situ*-RT-PCR geeignete silanisierte Objektträger (Perkin Elmer, Norwalk, USA), gebracht und für 6h bei 60° erhitzt; dann dreimal für 10min mit reinem Xylol entparaffinisiert und luftgetrocknet.

Im Weiteren erfolgte die partielle Proteolyse mittels Pepsin (sog. Pepsin-Andau) mit 7800U auf 100µl 0,1 molarer Salzsäure (0,1M HCl) für 10min in einer feuchten

Kammer bei Raumtemperatur. Die enzymatische Reaktion wurde durch 2min Behandlung in 0,1M NaCl und 0,1M Tris-HCl (pH 7,4) gestoppt. Die Schnitte wurden dann durch 5min Behandlung in reinem Alkohol dehydriert und schließlich luftgetrocknet.

2.2.9 *In Situ*-RT-PCR

Zum einen wurde konventionell mit Taq-Polymerase und vorausgehender Reverse Transkriptase-Reaktion gearbeitet; für die RT wurde folgendes Reaktionsgemisch ähnlich wie in Absatz 2.2.3 angesetzt (Tabelle 7).

RT Puffer	50µl
0,1M DTT	25µl
Oligo dT (20µM)	5µl
dNTP (10mM)	5µl
Reverse Transcriptase	5µl
RNAse-Inhibitor Rnasin	5µl
DEPC-Bidest	405µl
Ansatz, davon je 50µl Schnitt	500µl

Tabelle 7: Reaktionsgemisch für die konventionelle *In Situ*-Reverse Transcriptase

Es wurde ein Temperaturprofil von 60 min 42°C und 5min 90°C gewählt, anschließend auf 4°C gekühlt, die Schnitte wurden abschließend für 2-5min in Aqua-Bidest gewaschen.

Für die PCR wurde zunächst unter Zuhilfenahme des entsprechenden Kits (Taq DNA Polymerase, GibcoBRL, San Francisco, USA) wie in Tabelle 8 a und 8 b aufgelistet zusammengeführt.

MgCl ₂ -Lösung	60µl
10xPuffer	50µl
dNTP (10mM)	10µl
DEPC-Bidest	325µl
Mastermix	445µl

Mastermix	44,5µl
Primer 100µM (RACE PCR 3)	2,5µl
Primer 100µM (RACE PCR 8 reverse)	2,5µl
Taq-Polymerase	0,5µl
Reaktionsgemisch je Schnitt	50µl

Tabelle 8 a, b: Mastermix und Reaktionsgemisch für die *In situ*-PCR

Zusätzlich je eine Negativkontrolle ohne Primer und eine ohne Enzym.

Das Temperaturprofil der folgenden PCR ist in Tabelle 9 zusammengetragen.

	Temperaturprofil	
94°C	5min	
94°C	1min	
61°C	1min30sec	
72°C	1min	40mal
72°C	7min	
4°C	Ende	

Tabelle 9: Temperaturprofil für die *In Situ*-PCR

2.2.10 *In Situ*-RT-PCR mit rTth-Polymerase

Die hierbei verwandte rTth-Polymerase aus *Thermus thermophilus* hat in Anwesenheit von Mn^{2+} und eines speziellen Bicine-Puffers auch Reverse Transkriptase-Funktion, so dass ein Reaktionsgemisch für beide oben aufgeführten Schritte ausreichend war. Die RT-Fähigkeit der rTth-Polymerase ist der konventionellen Reverse Transkriptase unterlegen; es kommt aber zu keinem Substratverlust durch einen Wechsel des Reaktionsgemisches zwischen den beiden Schritten [33,34,35].

Zur Verwendung kam hier ein rTth DNA Polymerase und Puffer-Kit (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Tabelle 10 zeigt die Komponenten des Reaktionsgemisches.

DEPC-Bidest	29µl
dNTP	1µl
Mn(OA ₂)	6µl
EZ-Puffer (Bicine-Puffer)	10µl
Primer 100µM (RACE PCR 3)	1µl
Primer 100µM (RACE PCR 8 reverse)	1µl
rTth-Polymerase	2µl
Reaktionsgemisch je Schnitt	50µl

Tabelle 10: Reaktionsgemisch für eine *In Situ*-RT-PCR unter Verwendung von rTth-Polymerase

Jeweils eine Negativkontrolle ohne Primer bzw. Enzym wurden zusätzlich angesetzt. In der Wahl des Temperaturprofils wurde der vorgeschalteten Reverse Transkriptase-Reaktion Rechnung getragen (Tabelle 11).

	Temperaturprofil	
65°C	10min	
70°C	20min	
90°C	3min	
90°C	1min	
65°C	1min	
70°C	30sec	40mal
72°C	3min	
4°C	Ende	

Tabelle 11: Temperaturprofil für eine *In Situ*-RT-PCR unter Verwendung von rTth-Polymerase

2.2.11 Hybridisierung mit der Sonde

Analog zur Sondenhybridisierung *in vitro* nach dem Elektrobplot (siehe Kapitel 2.2.7) bzw. entsprechend der Empfehlungen des Herstellers (Boehringer Mannheim, Deutschland) wurde die Digoxigenin markierte Sonde mit den Gewebepräparaten nach der *In Situ*-PCR inkubiert und Anti-Dig-Fab-Fragment mit konjugierter AP dazu gegeben und wie folgt (s.u., Kapitel 2.2.13) detektiert.

2.2.12 Primed *In Situ* Labeling (PRINS)

Alternativ zur *In Situ*-Sondenhybridisierung bot sich diese Technik, bei der neben Digoxigenin-markierten Desoxyribonucleosidtriphosphaten Taq-Polymerase-Stoffel Fragment, entsprechende Puffer (Perkin Elmer, Norwalk, USA) und Primer, die im Bereich innerhalb des Primäramplifikates lagen (sog. nested primers), gegeben wurden. Dieses Enzym ist zum einen deutlich thermostabiler, so dass höhere Denaturierungstemperaturen gewählt werden konnten. Zum anderen besitzt es keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, was den unspezifischen Dig-dNTP-Einbau und damit falsch positive Signale an anderen (Gen-)Lokalisationen verhindern sollte. Ein weiterer Vorteil war (neben Zeitersparnis), dass die einzelnen Substrate besser zur Ziel-cDNA gelangen konnten, als die größere Sonde; ein Nachteil war, dass eine bessere Qualität der DNA-Matrize erforderlich war [36,37]. Nach 5-minütigem Spülen mit destilliertem Wasser, Dehydrieren in Ethanol absolut und Lufttrocknen wurde das Reaktionsgemisch wie in Tabelle 12 gelistet zusammengestellt. Das Temperaturprofil war: 3min 95°C, 1min 65°C, 30sec 70°C und Kühlen auf 4°C.

DEPC-Bidest	36µl
Dig-Labeling Mix (10mM)	1µl
MgCl ₂	6µl
Stoffelpuffer	5µl
Primer 100µM (RACE PCR 5)	1µl
Primer 100µM (RACE PCR 8 reverse)	1µl
Taq-Stoffel Fragment	0,25µl
Reaktionsgemisch je Schnitt	~50µl

Tabelle 12: Reaktionsgemisch für PRINS unter Zuhilfenahme von Digoxigenin-markierten Nukleosidtriphosphaten (Dig-Labeling Mix)

2.2.13 Detektion

Die Detektion verlief gemäß der Empfehlung des Herstellers (Dig Wash and Block Puffer Set, Boehringer Mannheim, Deutschland). Die mittels Sondenhybridisierung oder PRINS markierten Gewebeschnitte wurden zunächst zweimal für 10min mit dem BM Waschpuffer I gewaschen, anschließend für 20min mit dem Waschpuffer II,

dann wurde jeder Schnitt mit 100µl Waschpuffer II und Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragment 1:1000 gemischt, für 25min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend mit zweimal 10min Waschpuffer I und einmal 5min dem Detektionspuffer gewaschen. Nun wurde eine Tablette 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (NBT/BCIP, Boehringer Mannheim, Deutschland) in 10ml Aqua bidest gelöst und mit weiteren 40ml Aqua bidest vermischt, dann mit je 100µl dieser Lösung pro Schnitt in einer abgedunkelten feuchten Kammer unter regelmäßiger Sichtkontrolle etwa 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es sollte also das durch PRINS eingebaute Hapten Digoxigenin mittels eines Antikörper-Fab-Fragmentes, welches mit dem Enzym alkalische Phosphatase verbunden ist, das wiederum mit NBT/BCIP eine Farbreaktion induziert, detektiert werden.

Abschließend erfolgte die lichtmikroskopische Betrachtung und Auswertung.

2.2.14 Zusammenfassende Bemerkung, Variationen

Im Überblick wurde also versucht, aus den zur Mikroskopie standardisiert verarbeiteten Gewebeproben mRNA zu extrahieren, Intron überspannende cDNA herzustellen und zu amplifizieren. Diese sollte nach dem Blotten mittels Digoxigenin-Sonde dargestellt werden. Mit selbstkomplementären 5'-Adaptoren versehene äußere Primer sollten eine Vernetzung der einzelnen cDNA-Moleküle erreichen.

Nach den *In Vitro*-Vorversuchen sollte an den Gewebeschnitten eine RT-PCR mit anschließender Markierung über Sonde/alternativ über PRINS und Detektion über AP-konjugiertem Antikörper nebst entsprechendem Substrat durchgeführt werden. Die Hauptversuche wurden an zwei unterschiedlich arbeitenden Thermocyclern durchgeführt:

1. Zum einen an dem Perkin Elmer Gene Amp In Situ PCR System 1000; hier wurde das Reaktionsgemisch nach Applikation auf den speziellen Objektträger mittels Silikon-Cover und Metallklammern, die über ein sog. Assembly Tool angebracht wurden, hermetisch verschlossen und die Objektträger vertikal zwischen Heiz- bzw. Kühlrippen des Thermocyclers gestellt.

2. Zum anderen am MJ Research Peltier Thermal Cycler PTC-200 mit dem Aufsatz Twin Tower Block. Hier wurde dem Reaktionsgemisch ein doppelt konzentriertes, sonst aber nicht näher bezeichnetes visköses Agens, welches nach Herstellerangaben die Reaktionsvorgänge nicht beeinträchtigt, zugefügt (in der Zusammenstellung der einzelnen Reaktionsgemische wurde hier bewusst auf diese weitere Variante verzichtet, die Menge des Zusatzes betrug jedoch immer die Hälfte des Gesamtvolumens und es wurde die Aqua bidest-Menge um eben jene Differenz reduziert). Dieses Agens (sogenanntes Self-Seal Reagent) sollte die Reaktionskammer abdichten und Verdunstung aus dem Reaktionsgemisch unterbinden. Dann wurde ein Kunststoff-Rahmen um den Gewebeschnitt gelegt und die gefüllte Kammer mit einem Deckgläschen verschlossen, die Objektträger konnten dann zwischen horizontal verlaufenden Rippen untergebracht werden.

Weitere Variationen des Versuchsablaufs waren bei gleicher Schichtdicke von ca. 5µm gestaffelte Pepsin-Andau-Zeiten von 30sec in 30-Sekunden-Schritten bis 4min30sec. Hier wurde aufgrund der morphologischen Veränderungen des Gewebes 1min30sec als optimal angesehen. Die Schichtdicken der Gewebeproben lagen im Bereich von ca. 1 bis 10µm, um je 1µm ansteigend und unter Verwendung definierter Andau-Zeiten von 1min30sec.

Ferner wurden alternative Primer angewandt, die anderen Lokalisationen auf der mRNA-Sequenz entsprachen, sowie nicht mit selbstkomplementären 5'-Adaptoren versehene Primer bei den *In Situ*-Versuchen.

In der Tabelle 13 ist eine Übersicht der einzelnen Variationen mit der Anzahl der Gewebeproben dargestellt. Als weitere Kontrollen wurden auch Lymphknotenschnitte und bekannte Interleukin 8-spezifische Primer verwandt.

Versuchsreihe	Positivproben	Kein Primer	Kein Enzym	Enzym	Cycler	Gewebe	Labeling	Bemerkung
1	14	2	2	rTth	PE	Tonsille I+II	PRINS	
2	14	2	2	rTth	PE	Tonsille I	PRINS	
3	12	2	2	rTth	MJ	Tonsille I	PRINS	
4	12	1	1	rTth	MJ	Tonsille I+II	PRINS	
5	54	0	0	rTth	MJ	Tonsille I+II	PRINS	*
6	30	0	0	rTth	MJ	Tonsille I	PRINS	**
7	30	0	0	rTth	MJ	Tonsille I	PRINS	**
8	12	1	1	rTth	MJ	Tonsille I+II	PRINS	***
9	16	3	3	Taq	MJ	Tonsille III	Dig-Sonde	
10	11	3	3	Taq	MJ	Tonsille III	PRINS	
11	3	1	1	rTth	PE	Tonsille III	PRINS	Prim.*
12	3	1	1	rTth	PE	LK	PRINS	Prim.**
13	3	1	1	rTth	PE	LK	PRINS	Prim.*
14	3	1	1	rTth	PE	Tonsille III	PRINS	Prim.*

Tabelle 13: Zusammenstellung der *In Situ*-RT-PCR-Versuche. Erklärungen: rTth: *Thermus thermophilus* DNA-Polymerase; Taq: *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase; PE: Perkin Elmer Thermocycler; MJ: MJ Research Thermocycler; PRINS: Primed *in situ* Labeling; Dig-Sonde: Digoxigenin-markierte DNA-Sonde; LK: Lymphknoten.

* = ansteigende Andauzeit in 30-Sekunden-Schritten von 30sec bis 4min30sec

** = Gewebeschichtdicke ca. 1-10µm

*** = Andau 1min30sec, Gewebeschichtdicke 7-10µm

Prim. * = IL8 outer + inner up/low: bekannte Interleukin 8-spezifische Primer-Zusammenstellung

Prim.** = Primer Race 3-8 reverse und 5-8 reverse

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis von mRNA

Nach der mRNA-Extraktion aus dem standardisiert verarbeiteten, Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebe konnten mit den determinierten Primern Amplifikate von 310 (Primer RACE PCR 5 und RACE PCR 8 reverse) und 450 (Primer RACE PCR 3 und RACE PCR 8 reverse) Basenpaaren Länge nachgewiesen werden.

Andere Primer-Kombinationen zeigten nur unregelmäßig den Lokalisationen entsprechende PCR-Produkte (Abb. 2a und 2b).

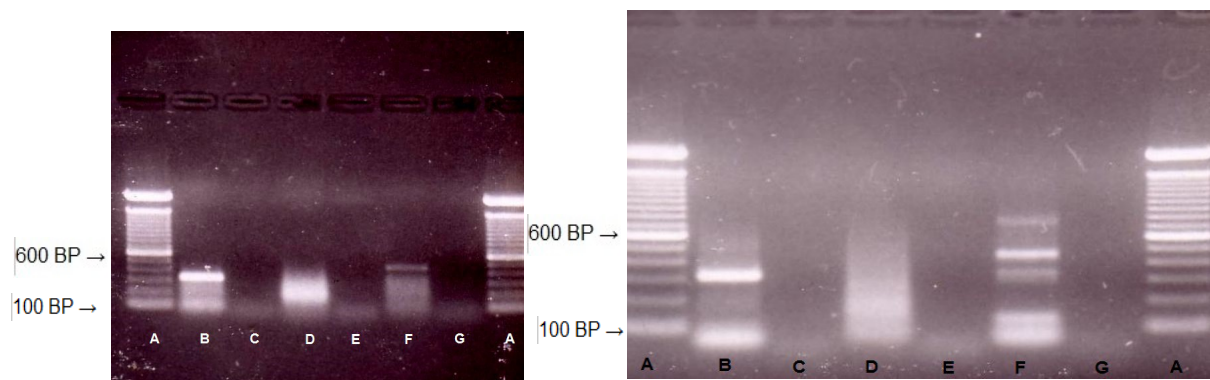


Abbildung 2a und b: Repräsentatives Beispiel eines Ergebnisses nach konventioneller RT-PCR und „Boost“-PCR Gelelektrophorese, Primer-Paare RACE PCR 5 und 8 reverse mit 310 BP (links) sowie RACE PCR 3 und 8 reverse mit 450 BP (rechts) zeigen gut erkennbare Amplifikationsprodukte, RACE PCR 5 mit RACE PCR end (385 BP) zeigt kein befriedigendes Ergebnis, rechts jeweils die Negativkontrolle ohne Polymerase. Die 100-BP-Leiter zeigt eine ca. dreifach stärkere Bande bei 600 BP. A) 100-BP-Leiter; B) RACE PCR 5 und 8 reverse; C) Negativkontrolle; D) RACE PCR 5 und end (385 BP); E) Negativkontrolle; F) RACE PCR 3 und 8 reverse; G) Negativkontrolle.

Beide Amplifikate entsprachen Intron überspannenden mRNA-Bereichen, d.h. die genomische DNA im Nucleus, aus der diese RNA-Abschnitte transkribiert wurden enthielten lange Abschnitte, die die mRNA im Zytoplasma nicht mehr enthielt. Aus der RNA wurden diese Bereiche vor dem Aus-Schleusen aus dem Zellkern herausgetrennt (Spleißen) [1,2].

Eine Vervielfältigung genomischer DNA über diese Primer-Kombinationen müsste also viel größere Moleküle hervorbringen, bzw. aufgrund der erheblichen Länge der DNA-Stränge kein deutliches Amplifikationsergebnis zu sehen sein.

3.2 Nachweis mittels DNA-Sonde

Die RT-PCR-Produkte konnten nach dem Elektrophoretogram von der Sonde spezifiziert werden. Die Anordnung der PCR-Produkte im Elektrophorese-Gel war identisch mit der der Signale auf der Nitrozellulosemembran. Die Chemilumineszenz-Signale entstanden durch die Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase, welche wiederum an das Antikörperfragment gekoppelt waren, das mit dem Digoxigenin der Sonde reagierte (Abb. 3 und 4).

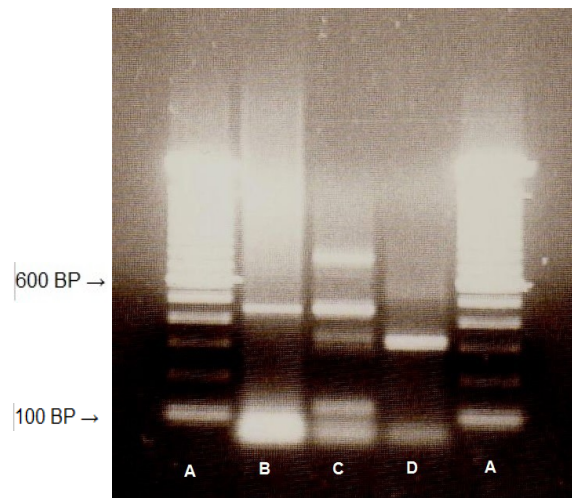


Abbildung 3: „BOOST“-PCR mit vorausgegangenen PCR-Produkten (RACE PCR 3 und 8 reverse sowie 5 und 8 reverse) als Template, repräsentatives Beispiel. Deutliche Banden bei 310 und 450 BP. A) 100-BP-Leiter; B) und C) RACE PCR 3 und 8 reverse; D) RACE PCR 5 und 8 reverse.

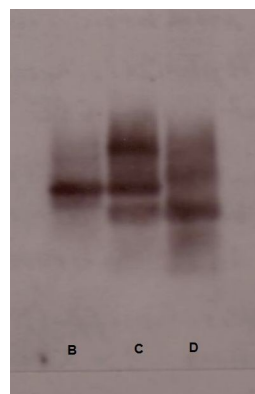


Abbildung 4: Southern Blot-Analyse. Gezeigt ist eine Nitrozellulosemembran nach Übertragung der PCR-Produkte aus Abb. 3, Immunodetektion und Substratfärbung. Die Anordnung der Signale ist identisch mit den Banden im Gel. (s. Auch Abb. 3) B) und C) RACE PCR 3 und 8 reverse; D) RACE PCR 5 und 8 reverse.

3.3 Primer mit selbstkomplementären 5'-Adapttern

Äußere Primer mit selbstkomplementären „tandem repeats“ als 5'-Adapter und den sonst identischen Nukleotidsequenzen amplifizierten entsprechend der Bande in der Elektrophorese das gleich große Primäramplifikat, zusätzlich wies die mit der Zykluszahl zunehmende Signalverstärkung oberhalb der Bande auf die Vernetzung (Konkatamer-Bildung) als Folge der Hybridisierung der komplementären Enden hin (Abb. 5).

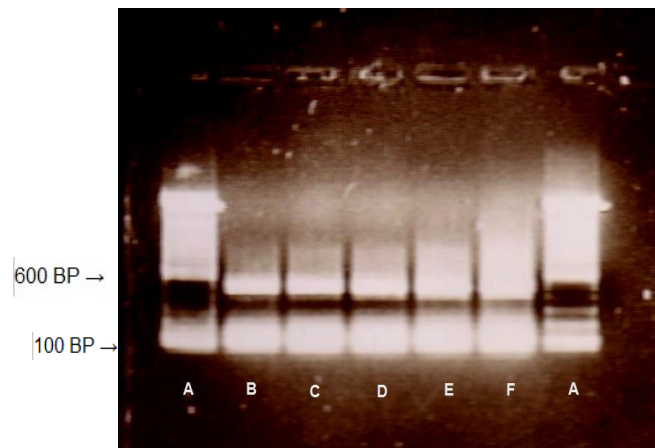


Abbildung 5: PCR mit den Primern RACE PCR 3 und 8 reverse mit selbstkomplementären 5'-Adapttern. Von links nach rechts ansteigende Zahl der Zyklen. Neben der Bande bei 450 BP zeigt sich mit zunehmender Zykluszahl eine Signalverstärkung oberhalb der Bande. A) 100-BP-Leiter; B) 40 Zyklen; C) 45 Zyklen; D) 50 Zyklen; E) 55 Zyklen; F) 60 Zyklen

3.4 *In Situ*-RT-PCR

Die *In Situ*-RT-PCR zeigte bei analoger Fragestellung, gleichen Materialien und identischem Gewebe kein spezifisches Signal. Insbesondere eine zytoplasmatisch lokalisierte Farbreaktion war nicht zu erkennen; die halbmondförmige Anordnung um die Reaktionszentren der Tonsille, wie in der konventionellen immunhistochemischen Färbung zuvor beschrieben, ließ sich hier nicht reproduzieren.

Lediglich im Nukleus der Zellen war eine Farbreaktion nachweisbar.

Variationen bzgl. Schichtdicke des Gewebes und Zeit des Pepsin-Andaus erbrachten keine besseren Ergebnisse. Vorteile der rTth-Polymerase gegenüber konventioneller RT ließen sich wohl bei der Verarbeitung, nicht aber bei dem Endergebnis ausmachen. Unterschiede zwischen PRINS und *In Situ*-Hybridisierung mittels Sonde zeigten sich in Bezug auf das Ergebnis ebenfalls nicht (Abb. 6a und 6b).

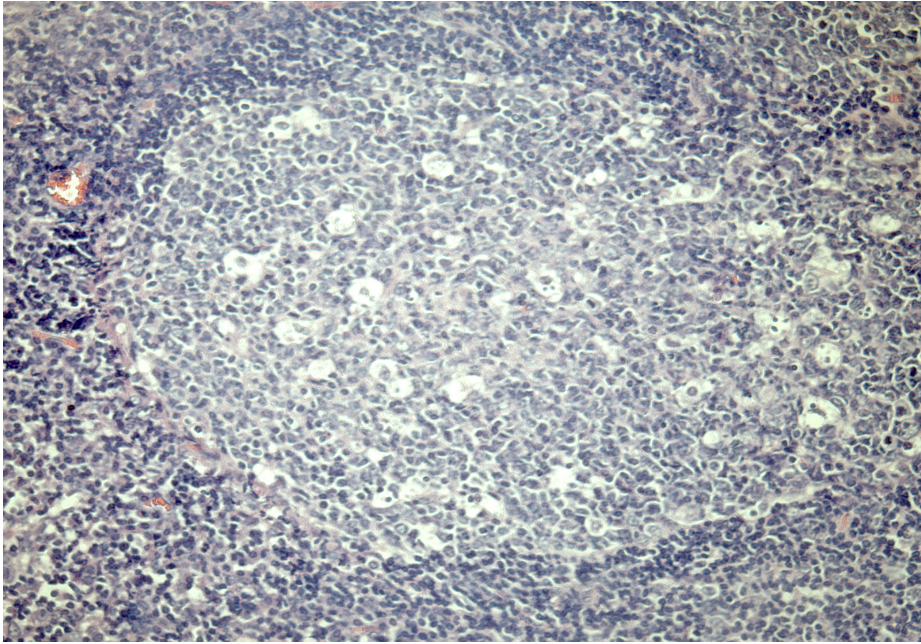


Abbildung 6a: Tonsillenschnitt nach *In Situ*-RT-PCR, Immunostaining mit NBT/BCIP, kein Counterstaining. 200-fache Vergrößerung. Zentral zeigt sich ein Sekundärfollikel mit marginalem T-Lymphozytenwall. Die zuvor beschriebene halbmondförmige, Ki-67 assoziierte Demarkierung zeigt sich nicht.

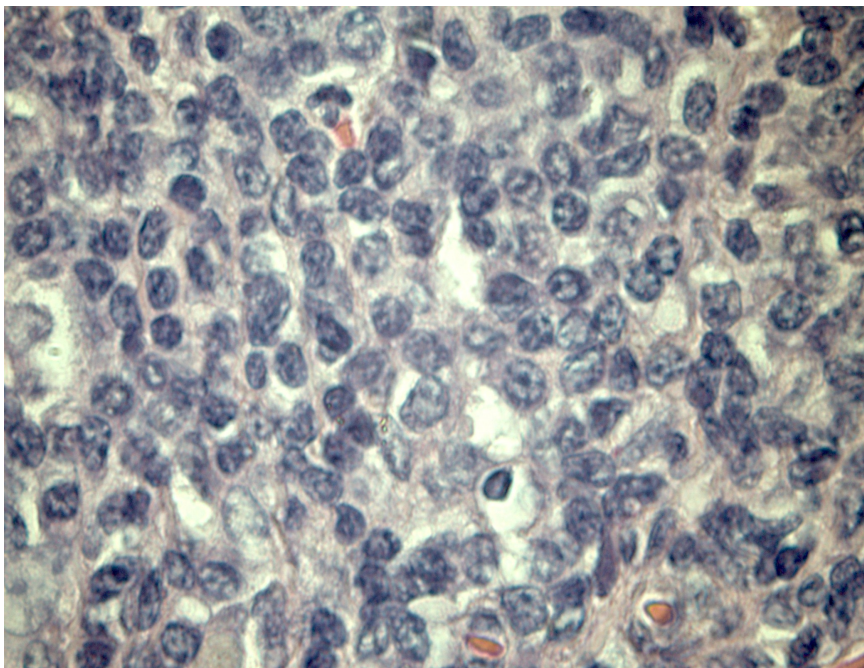


Abbildung 6b: Tonsillenschnitt nach *In Situ*-RT-PCR, Immunostaining mit NBT/BCIP, kein Counterstaining. 1000-fache Vergrößerung. B-Lymphozyten im Sekundärfollikel. Es zeigt sich nur ein Farbsignal im Nukleus. Die mRNA sollte jedoch im Zytoplasma, nicht (nur) im Kern nachweisbar sein.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Endergebnissen in den unterschiedlichen Thermocyclern ließ sich so ebenfalls nicht erkennen. Lediglich bei den drei letztgenannten Varianten waren die Verwendung von rTth-Polymerase, PRINS und der Gebrauch des Thermocycler PTC-200 mit Zusatzmaterialien weniger zeit- und materialaufwändig.

4. Diskussion

Aus Tonsillengewebe, welches in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde, konnte mRNA für das Ki-67Antigen extrahiert und mittels *In Vitro*-RT-PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen werden.

Die besten Ergebnisse wurden mit den Primer-Paaren erzielt, die ein 310 BP und ein 450 BP großes cDNA-Molekül amplifizieren. Die Spezifität des Amplikons konnte nach Southern Blot mit *In Situ* Hybridisierung einer Digoxigenin-gekennzeichneten Sonde verifiziert werden.

Die auf die Vorversuche folgende *In Situ*-RT-PCR mit der gleichen Fragestellung konnte zu keinem überzeugenden Ergebnis führen. Dies änderte sich auch bei verschiedenen, oben beschriebenen Variationen nicht. Durch die zuvor dargestellte Sequenz des Ki-67-Antigens und die sicher belegte Verteilung von Arealen mit hoher Genexpression [21], konnte ein positives Ergebnis sicher von anderen Ergebnissen diskriminiert werden. Das Immuno-Staining zeigte keine zytoplasmatischen Signale. Auch ließ sich die zuvor beschriebene charakteristische Halbmondform am Rand der Reaktionszentren der Sekundärfollikel nicht darstellen.

Dies lässt sich unterschiedlich interpretieren.

Generell ist anzumerken, dass die meisten Autoren eine sorgfältige Überprüfung und Optimierung aller Einzelschritte dieses Verfahrens nahelegen. Ferner wird Wert darauf gelegt, Unterschiede zwischen der *In Situ*- und der konventionellen *In Vitro*-PCR aufzuzeigen. So ist die Amplifikation *in situ* beispielsweise eher linear, während sie *in vitro* exponentiell ist (bei Zahl der Zyklen= n : $2^{n-1}+2n$), [11]. Auch das Problem der unterschiedlichen Kompartimente im Material wird hervorgehoben, das hier später behandelt wird.

Eine Diskussion möglicher Fehlerquellen oder Varianten, die für den ausbleibenden Nachweis verantwortlich sind, lässt sich sinnvollerweise in die Arbeitsbereiche Prä-PCR, PCR und Post-PCR unterteilen.

Prä-PCR

Die Halbwertszeit von mRNA beträgt etwa 10 Minuten. Um diese im Gewebe noch nachweisen zu können, ist es also notwendig, frühzeitig mit gepuffertem Formalin zu fixieren. Formalin durchdringt das Gewebe mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 Millimetern pro Stunde. Deshalb wurde darauf geachtet, das intraoperativ gewonnene Material noch im OP in Formalin einzulegen und über Nacht bei 4°C zu lagern. Die Ergebnisse der konventionellen RT-PCR legen nahe, dass die Ziel-mRNA noch intakt war [33,34], wobei das Amplifikat teilweise erst nach einer „Boost“-PCR deutlich zu erkennen war.

In unterschiedlichen Protokollen wurden alternative fixierende Agenzien diskutiert, unter anderem Glutaraldehyd, Bouin's Fixativ, Ethanol und schwermetallhaltige Fixative, die allerdings keine quer vernetzenden Eigenschaften haben, sowie die Cryo-Fixierung, bei der die Morphologie der Zellen leidet. Der Verarbeitung mit Formalin und Paraffin wurde der Vorzug gegeben, da hier zuvor gute Ergebnisse erzielt werden konnten und es sich letztlich um eine weit verbreitete Konservierungs- und Einbettungsmethode handelte [11,12,13,14,18,33,34].

Auf die sorgsame Optimierung des Andaus des Gewebes wird häufig verwiesen [11,12,33,34]. Prinzipiell bewirkt eine zu geringe proteolytische Vorbehandlung, dass die Zell-eigenen Barrieren undurchlässig bleiben, was insbesondere für die größeren Enzyme (Taq Polymerase mit einer Masse von ca. 94kDa) bedeuten kann, dass sie nicht zum Zielort, respektive zur Ziel-Nukleinsäure gelangen. Eine zu intensive Peptidaufspaltung kann jedoch zur Folge haben, dass einerseits das Amplikon aus dem Zellverband gewaschen werden kann, andererseits die Zellmorphologie lichtmikroskopisch nicht mehr nachvollziehbar geschädigt ist.

Neben den möglichen Proteasen Trypsin und insbesondere Proteinase K wurde Pepsin bevorzugt, da das Ausmaß der Proteolyse gut über den pH-Wert des Mediums steuerbar sei und die Zellmorphologie eher erhalten bliebe [33,34].

Andererseits wurde der Proteinase K zugesprochen, nach dem Vernetzen durch Formalin die RNA besser aus dem Molekülverband zu lösen [10,13,14,18].

Zur Ermittlung wurden hier aufsteigende Reihen bzgl. Andauzeit und Schichtdicke des histologischen Schnittes durchgeführt, die allerdings keine hilfreichen Aussagen erbrachten.

Lewis empfahl die Vorbehandlung des Gewebes mittels Mikrowellen, zum einen zur Protein-Denaturierung, zum anderen unter der Vorstellung, dass so die DNA-Doppelhelix aufgetrennt wurde und so keine Exonuclease-Reparatur unter Verwendung von gelabelten Nukleotiden stattfand [10]. Dies sei gerade bei der direkten *In Situ*-PCR, bei der also schon in der ersten PCR markierte Nukleotide eingebaut werden, vorteilhaft. Andere Autoren wichen hiervon ab [38].

Teilweise wurde die Vorbehandlung mit RNase-freier DNase empfohlen [12]; dies sei allerdings nicht vonnöten, wenn—wie hier—eine Exon-Exon-überbrückende mRNA Zielsequenz ausgewählt wurde [33].

Die Behandlung mit RNase-Inhibitoren wurde mitunter aufgeführt, Lewis verwies andererseits drauf, dass RNAsen durch die Formalinfixierung und Proteolyse bereits inaktiviert seien [18].

Kritisch wurde auch der Gebrauch von DEPC, welches die RNAsen hemmt, beurteilt, da es zur Carboxymethylation der RNA komme und so weniger cDNA aus der degenerierten RNA revers transkribiert werden könne [18].

PCR

Es wurde empfohlen, die äußeren Primer so zu wählen, dass ein Amplifikat von 200-300 BP bzw. 200-350 BP Größe entstehe [10,33,34]. Das hier zur Anwendung kommende Primer-Paar definierte eine cDNA von 450 BP, also deutlich größer, zeigte aber die besten Ergebnisse in der konventionellen RT-PCR. Der Downstream-Primer war bei äußerem und innerem Paar identisch, also bestand keine eindeutige „nested primer“-Situation. Aufgrund der besten *In Vitro*-Signale wurde jedoch diese Konstellation gewählt. Für eindeutige Ergebnisse wurde bei dem konventionellen RNA-Nachweis eine „Boost“-PCR zur Verstärkung der Banden verwandt. Dies legt letztlich eine geringe Anzahl intakter Kopien nahe und muss als ungünstig für die folgende *In Situ*-RT-PCR gewertet werden. Peters und Kollegen haben für die Reverse Transkriptase *in situ* den Downstream-Primer vorgeschlagen [34]. In der *In Vitro*-PCR wurden allerdings analoge Ergebnisse mit Oligo-dT-Primern erzielt.

Die Komponenten des PCR-Reaktionsgemisches wurden eng nach den Empfehlungen von Peters und Kollegen zusammengestellt [33,34], wobei auch die sorgfältige Anpassung an optimale Arbeitsbedingungen angeraten wird. Einzelne Kits

wurden von den Herstellern mit optimierten Agenzien (Puffer, Elektrolyte, Enzyme) für die entsprechenden Reaktionen geliefert. Die Fülle der unterschiedlichen Empfehlungen zu einzelnen Bestandteilen (z. B. Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid oder Gelatine) aus den unterschiedlichen Veröffentlichungen kann hier nicht im Einzelnen diskutiert werden.

Ein interessanter Gedanke, der allerdings nach Abschluss des praktischen Teils dieser Arbeit aufkam, war der Vorschlag von Gu, das *In Situ*-Reaktionsgemisch nach Abschluß der *In Situ*-RT-PCR beim Spülen zu asservieren und als Template für eine erneute konventionelle PCR mit gleichen Primern zu benutzen [11]. Somit hätte mehr Information über die Existenz einer cDNA aus dem Zielbereich gewonnen werden können.

Post-PCR

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Nachweisverfahren angewandt. Die Detektion mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde, die *in vitro* bereits nach dem Elektrophoretogramm ein spezifisches Ergebnis erbracht hatte, und „primed *in situ* labeling“ (=PRINS). *In situ* zeigten beide Verfahren trotz analoger Bedingungen keinen positiven Nachweis. Theoretisch ist gerade bei Vernetzung und unsicherem Proteolyse-Status das PRINS Mittel der Wahl, da seine Substrate leichter zum Zielort gelangen [37].

Hinsichtlich des Antikörpernachweises wird als Alternative bei einigen Autoren als Hapten dem Biotin der Vorzug gegeben und über das Biotin, Avidin und Alkalische Phosphatase detektiert [38]. Ob dies allerdings relevante Unterschiede in Hinblick auf die Signalstärke im Gewebe darstellt, ist wahrscheinlich eher zweitrangig.

Die dargestellte Anfärbung des Zellkerns ihrerseits ist als unspezifisch zu werten oder nur spekulativ zu deuten. Vorangestellt werden muss, dass in Negativkontrollen jeweils ohne Primer oder ohne Enzym kein nukleäres Staining auszumachen war. Zum einen könnte es sich um ein Mispriming, also ein fehlerhaftes Annealing der Primer an einen nicht exakt komplementären Abschnitt der genomischen DNA im Zellkern gehandelt haben. Ferner könnte es bei dem Detektionsversuch mit der Digoxigenin-labelten DNA-Sonde zu einer fehlerhaften Hybridisierung im Bereich einer

ähnlichen, aber genomischen DNA-Sequenz gekommen sein. Weiterhin ist ein sogenanntes endogenes Priming mit Gewebe eigenen DNA- Fragmenten oder cDNA-Fragmenten, die aus der Reverse Transkriptase-Reaktion entstanden sind und als Primer dienten, möglich [39].

Sowohl Primer, als auch Sonde könnten ein dem Ki-67 Gen verwandtes und der mRNA ähnliches Pseudogen (sog. processed pseudogene) detektiert haben [18,40,41]. Eine weitere Erklärung könnte ein Reparaturvorgang und konsekutiver Einbau Digoxigenin-markierter Desoxyribonucleosidtriphosphate an der genomischen DNA sein. Bei dem verwendeten Stoffelfragment handelt es sich allerdings um eine DNA-Polymerase I, welche sich durch eine fehlende 5'-3'-Exonuclease-Fähigkeit auszeichnet, da die 5'-3'-Exonuclease-Domäne entfernt wurde und welche bereits in ihrer natürlichen Form keine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität besitzt [42]. Prinzipiell hätte jedoch im Nukleus verbleibende (also nicht ausreichend fortgespülte) Taq- bzw. rTh-Polymerase diese Reparaturmechanismen ausführen können.

Letztlich wäre eine mögliche Erklärung, das Farbsignal deute auf bereits gespleißte, jedoch noch nicht aus dem Zellkern transportierte mRNA, die möglicherweise gerade durch den Schutz der Kernhülle noch im Gewebeverband geblieben ist, hin.

Die Verwendung einer DNase vor der RT-PCR hätte in dieser Situation möglicherweise weitere Aussagen erbringen können.

Bereits 1994 haben Komminoth und Kollegen bei dem RNA-Nachweis von Hepatitis C-Genom in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Leberbiopsien die *In Situ*-RT-PCR als unzureichendes Diagnostikum beschrieben, wobei die direkte *In Situ*-RT-PCR falsch positive, die indirekte falsch negative Ergebnisse erbrachte. Am verlässlichsten war hier die serologische und konventionelle histologische Diagnostik, während von den molekularbiologischen Verfahren die RNA-Extraktion aus dem Gewebematerial und konventionelle RT-PCR am sichersten zu sein schien [39].

Long und Komminoth haben weiterhin 1994 die Spezifität positiver Farbsignale in *In Situ*-PCR-Versuchen auf Glas-Objektträgern angezweifelt und die Signale als

Artefakte in Folge von DNA-Reparaturmechanismen oder endogenem Priming durch genomische DNA- oder cDNA-Fragmente gewertet [43,44].

2001 haben Steel und Kollegen in Dünndarm und Hypophyse von Ratten Galanin determinierende mRNA-Abschnitte nachgewiesen, hierbei stellten sie der konventionellen *In Situ* Hybridisierung die direkte und indirekte *In Situ*-RT-PCR gegenüber. Während bei der direkten *In Situ*-RT-PCR nicht alle erwarteten Positiv-Signale darstellbar waren und einige Negativkontrollen falsch positive Ergebnisse erbrachten, zeigte die indirekte *In Situ*-RT-PCR unzureichende mRNA-Markierungen bei falsch positiven inhomogenen Signalen („high background“) [45].

Persico und Kollegen haben 2006 bei der Darstellung von HIV-Genom in Samenmaterial die *In Situ*-RT-PCR gegenüber konventionellen Verfahren als ungeeignet, sowohl in Hinblick auf falsch positive, wie auch falsch negative Ergebnisse, beschrieben [46]. Auch werden vorausgegangene Untersuchungsergebnisse anderer Autoren hinterfragt.

Wie in der Einleitung (siehe Kapitel 1.1) bereits erwähnt, hatte Lewis 2001 die *In Situ*-RT-PCR als wenig verlässlich und reproduzierbar eingeschätzt und die Methode als sinnvolles Instrument vornehmlich in Referenzlaboren gesehen. Weiter führt er alternativ die Möglichkeit einer *In Situ* Hybridisierung mit Signalverstärkung auf [18,47,48] oder die Verwendung anderer Marker neben Digoxigenin als Hapten, die deutlichere Signale bei kleiner Anzahl von RNA-Molekülen im Rahmen einer konventionellen, nicht Radioisotope verwendenden ISH, bieten sollen [18,49].

Eine aktuellere Zusammenstellung der Protokolle für die *In Situ*-PCR und die *In Situ*-RT-PCR von Bagasra aus dem Jahr 2007 enthält einige erwähnenswerte Aspekte [50]: Zunächst wird die Formalinfixierung und Paraffineinbettung weiter als Routine-Gewebe-Präparation und die Konservierung mit den günstigsten Ergebnissen für weitere Diagnostik umschrieben. Als Mittel der Wahl zum Andau wird jedoch Proteinase K empfohlen. Alternativ zu spezifischen Primern für die Reverse Transkriptase-Reaktion wird die Verwendung von Hexameren mit zufälliger Sequenz (sog. random primers) *in situ* erwähnt, aber für die spezifische Primer-Auswahl wird hier eine Intron-überspannende Position vorgeschlagen, so dass die Primer nur an

die gespleißte mRNA hybridisieren. Die DNase-Behandlung des Gewebes vor der RT-PCR wird nahegelegt. Für die Detektion des Amplikons wird die Verwendung einer Sonde mit alternativ Digoxigenin-, Biotin- oder Fluoreszenz-Marker-Kennzeichnung empfohlen.

In Bezug auf die beiden in dieser Arbeit verwandten Thermocycler bleibt zu erwähnen, dass die Vorbereitung der Proben und die Bedienbarkeit des PTC-200 etwas flüssiger und weniger materialaufwendig erschienen.

Bei analogen Fragestellungen scheint heutzutage die (Laser Capture) Mikrodisektion, RNA-Isolierung aus den Mikrosegmenten, *In Vitro*-RT und abschließend konventionelle bzw. quantitative real-time PCR deutlich überlegen zu sein und kommt weitläufig zum Einsatz [18,51,52,53,54,55]. Das heißt, Gewebe wird auf einer thermoplastischen Membran aufgebracht und Fragmente aus den Zielorten im Zellverband mittels Laser-Mikrodisektion herausgetrennt. Weiter wird nach RNA-Extraktion eine *In Vitro*-RT-PCR durchgeführt. Bei der Real-Time-PCR kann zusätzlich über einen Chemilumineszenzmechanismus eine Quantitative Aussage zur RNA-Konzentration gemacht werden, also kann so (analog zur erhofften Signalstärke bei der *In Situ*-RT-PCR) das Ausmaß der Genexpression eingeschätzt werden.

5. Zusammenfassung

Die *In Situ*-(RT)-PCR stellt die Kombination der hochspezifischen *In Situ* Hybridisierung und der hoch sensitiven Polymerase Kettenreaktion dar. Diese in den 1990er Jahren vorgestellte, vielversprechende Koppelung zweier gängiger und bewährter Nachweismethoden in der molekularbiologischen Diagnostik sollte zu den unterschiedlichsten Fragestellungen aufschlussreiche Erkenntnisse bieten. Spezifische DNA- oder RNA-Abschnitte sollten hierdurch nachgewiesen und im Gewebeverband lokalisiert werden können. Weiterhin wurde der Vorzug dieser Methode hervorgehoben, in Paraffin-eingebettetem und Formalin-fixiertem Material auch nach Jahren noch Nachweise zu erbringen, wobei es sich um eines der ältesten und am häufigsten angewandten Konservierungsmethoden handelt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Verfahren am Beispiel der Ki-67-mRNA-Verteilung in der Gaumenmandel erprobt und als Routine-Diagnostikum weiter etabliert werden. Bekannt war die charakteristische, halbmondförmige Signalverteilung im histologischen Präparat und damit das Ausmaß der Genexpression in den Reaktionszentren der Tonsillenfollikel. Aus in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Tonsillengewebe konnten intakte, Intron-überspannende mRNA-Abschnitte des Proliferationsgens Ki-67 mit einer Größe bis zu 450 Basenpaaren extrahiert und mittels konventioneller RT-PCR dargestellt werden. Durch die Southern Blot-Methode und die *In Situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde konnte die Spezifität des RNA-Nachweises weiterhin belegt werden. Der Nachweis der Ki-67 spezifischen mRNA mittels *In Situ*-RT-PCR gelang im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht. Die Anwendung von unterschiedlichen Variationen des Verfahrens, Versuche der Prozessoptimierung und Fehlerelimination konnten diesen Umstand nicht ändern. Eine Anfärbung im Zellkern der Lymphozyten ist als unspezifisch zu werten oder nur spekulativ zu deuten.

Zusammenfassend bleibt anzumerken, dass es sich bei der *In Situ*-RT-PCR um eine arbeitsaufwendige, viele mögliche Fehlerquellen beinhaltende Methode handelt. Die hier vorgelegten Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieses Verfahren, trotz des ursprünglich eingeschätzten gewaltigen Potentials, für eine breite Anwendung, zum Beispiel in der klinischen Diagnostik, letztlich nicht geeignet ist.

6. Literaturverzeichnis

[1] Buddecke, E. (1989):

Grundriss der Biochemie, 8. Auflage
de Gruyter, Berlin

[2] Stryer, L. (1996):

Biochemie, 4. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

[3] Sanger, F. (1981):

Determination of nucleotide sequences in DNA.
Science. 214(11), 1205-1210

[4] Mullis, K. B.(1990) :

Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion.
Spektrum der Wissenschaft 6, 60-67

[5] Haase, A.T.; Retzel, E. F.; Staskus, K. A. (1990):

Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells.
Proc Natl Acad Sci USA. 87(13), 4971-4975

[6] Komminoth, P.; Long, A. A.; Ray, R., Wolfe, H. J. (1992):

In situ polymerase chain reaction detection of viral dna, single-copy genes, and gene rearrangements in cell suspensions and cytopins.
Diagn Mol Pathol. 1(2), 85-87

[7] Nuovo, G. J.; MacConnell, P.; Forde, A.; Delvenne, P. (1991):

Detection of human papillomavirus dna in formalin fixed tissues by *in situ* hybridisation after amplification by polymerase chain reaction.
Am J Pathol. 139(4), 847-854

[8] Nuovo, G. J.; Gallery, F.; MacConnell, P.; Becker, P.; Bloch, W. (1991):

An improved technique for the detection of dna by *in situ* hybridisation after pcr amplification.
Am J Pathol. 139(6), 1239-1244

[9] Bagasra, O.; Hauptman, S. P.; Lischner, H. W.; Sachs, M.; Pomerantz R. J. (1992):

Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction.
N Engl J Med. 326(21), 1385-1391

[10] Lewis, F. (1996):

An Approach to *In Situ* PCR
PE Applied Biosystems, Foster City

[11] **Gu, J. (1995):**

In Situ PCR – An Overview.

In: Gu, J. (Hrsg.): *In Situ* Polymerase Chain Reaction and related Technology, 5. 1-21,

Eaton Publishing Co./Birkhäuser, Boston

[12] **Long, A.A.; Komminoth, P. (1995):**

In Situ PCR: General Methodology and Recent Advances.

In: Gu, J. (Hrsg.): *In Situ* Polymerase Chain Reaction and related Technology, 5. 23-34

Eaton Publishing Co./Birkhäuser, Boston

[13] **Bagasra, O.; Seshemma, T.; Hansen, J.; Bobroski, L.; Saikumari, P.; Pomerantz, R. J. (1995):**

Applications of *In Situ* PCR Methods in Molecular Biology.

In: Gu, J. (Hrsg.): *In Situ* Polymerase Chain Reaction and related Technology, 5. 35-67

Eaton Publishing Co./Birkhäuser, Boston

[14] **Zevallos, E. A.; Bard, E.; Anderson, V. M.; Choi, T.-S.; Gu, J. (1995):**

Conventional PCR, *In Situ* PCR and Reverse Transcription *In Situ* PCR for HIV Detection.

In: Gu, J. (Hrsg.): *In Situ* Polymerase Chain Reaction and related Technology, 5. 77-98

Eaton Publishing Co./Birkhäuser, Boston

[15] **Anderson, V. M. (1995):**

In Situ PCR: New Frontier for Histopathologists.

In: Gu, J. (Hrsg.): *In Situ* Polymerase Chain Reaction and related Technology, 5. 131-137

Eaton Publishing Co./Birkhäuser, Boston

[16] **Nouvo, G. J.; Gorgone, G.A.; MacConnell, P.; Margiotta, M.; Gorevic, P. D. (1992):**

In situ localization of PCR-amplified human and viral cDNAs.

PCR Methods Appl. 2(2), 117-123

[17] **Chen, R. H.; Fuggle, S. V. (1993):**

In situ cDNA polymerase chain reaction. A novel technique for detecting mRNA expression.

Am J Pathol. 143(6), 1527-1534

[18] **Lewis, F.; Maughan, N. J.; Smith, V.; Hillan, K.; Quirke, P. (2001):**

Unlocking the archive-gene expression in paraffin-embedded tissue.

J Pathol. 195(1), 66-71

[19] **Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. (1983):**

Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.

Int J Cancer. 31(1), 13-20

[20] **Gerdes, J.; Li, L.; Schlüter, C.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Gerlach, C.; Stahmer, I.; Kloth, S.; Brandt, E.; Flad, H.-D. (1991):**

Immunobiochemical and molecular biologic characterisation of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67.

Am J Pathol. 138(4), 867-873

[21] **Schlüter, C.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Becker, M. H. G.; Key, G.; Flad, H.-D.; Gerdes, J. (1993):**

The cell proliferation-associated antigen of antibody ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins.

J Cell Biol. 123(3), 513-522

[22] **Leonhardt, H. (1990):**

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 8. Auflage

Thieme Verlag, Stuttgart; New York

[23] **Kühnel, W. (1989):**

Taschenatlas der Zytologie, Histologie und der mikroskopischen Anatomie, 7. Auflage

Thieme Verlag, Stuttgart; New York

[24] **Scholzen, T.; Gerdes, J. (2000):**

The Ki-67 protein: from the known and the unknown.

J Cell Physiol. 182(4), 311-322

[25] **Leuschner, I.; Langhans, I.; Schmitz, R.; Harms, D.; Mattke, A.; Treuner, J. (2003):**

p53 and mdm-2 expression in rhabdomyosarcoma of childhood and adolescence:

Clinipathologic study by the Kiel Pediatric Tumor Registry and the German

Cooperativ Soft Tissue Sarcoma Study.

Pediatr Dev Pathol. 6(2), 128-136

[26] **Decker, T.; Böcker, W. (2013):**

Ki 67-Proliferationsindex.

In: Klöppel, G.; Kreipe, H. H.; Remmele, W. (Hrsg.): Pathologie; Mamma, Weibliches Genitale, Schwangeschaft und Kindererkrankungen, Band 4

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 3. Auflage

[27] **Boenninghaus, H.-G. (1993):**

Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Medizinstudenten, 9. Auflage

Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York

[28] **Tyrrell, L.; Elias, J.; Longley, J. (1995):**

Detection of specific mRNAs in routinely processed dermatopathology specimens.

Am J Dermatopathol. 17(5), 476-483

[29] **Santer, G.; Schneider, C. (1991):**

RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification.

Biotechniques. 11(3), 304-308

- [30] **Chiu, K. P.; Cohen, S. H.; Morris, D. W.; Jordan, G. W. (1992):**
Intracellular amplification of proviral DNA in tissue sections using the polymerase chain reaction.
J Histochem Cytochem. 40(3), 333-341
- [31] **Aaij, C.; Borst, P. (1971):**
The Gel Electrophoresis of DNA.
Biochim Biophys Acta. 269, 192-200
- [32] **Southern, E. M. (1975):**
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J Mol Biol. 98(3), 503-517
- [33] **Peters, J.; Krams, M.; Wacker, H. H.; Carstens, A.; Weisner, D.; Hamann, K.; Menke, M.; Harms, D.; Parwaresch, R. (1997):**
Detection of rare RNA sequences by single-enzyme *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction.
Am J Pathol. 150(2), 469-476
- [34] **Peters, J.; Krams, M.; Koop, A.; Determann, O.; Hamann, K.; Schild, T.; Parwaresch, R.; Klöppel, G. (1997):**
In Situ Reverse Transcriptase Polymerase Kettenreaktion.
Manual aus dem Institut Pathologie, CAU Kiel
- [35] **Myers, T. W.; Gelfand, D. H. (1991):**
Reverse transcription and DNA amplification by a thermus thermophilus DNA polymerase.
Biochemistry. 30(31), 7661-7666
- [36] **Koch, J.; Kolvraa, S.; Petersen, K. B.; Gregersen, N.; Bolund, L. (1989):**
Oligonucleotide- priming methods for the chromosome-specific labelling of alpha satellite DNA *in situ*.
Chromosoma. 98(4), 259-265.
- [37] **Koch, J. (2003):**
Primed *In Situ* Labeling.
In: Fan, Y.-S.(Hrsg.):Methods in Molecular Biology, Vol. 204: Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications, 5. 77-84
Humana Press, Totowa, USA
- [38] **Lewis, F. (1996):**
In situ PCR on paraffin-embedded tissue improved by microwave pretreatment.
Biosystems Reporter (Perkin Elmer), Volume 1, 3+17
- [39] **Komminoth, P.; Adams, V.; Long, A. A.; Roth, J.; Saremaslani, P.; Flury, R.; Schmid, M.; Heitz, Ph. U. (1994):**
Evaluation of methods for Hepatitis C Virus detection in archival liver biopsies.
Path Res Pract. 190, 1017-1025

[40] **Vanin, E. F. (1985):**

Processed pseudogenes: characteristics and evolution.
Annu Rev Genet. 19, 253-272

[41] **Gerstein, M.; Zheng, D. (2006):**

The real life of pseudogenes.
Sci Am. 295(2), 48-55

[42] **Lawyer, F. C.; Stoffel, S.; Saiki, R. K.; Chang, S.-Y.; Landre, P. A.; Abramson, R. D.; Gelfand, D. H. (1993):**

High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity.
PCR Methods Appl. 2(4), 275-287

[43] **Long, A.A.; Komminoth, P. (1997):**

In Situ PCR, An overview

In: Gosden, J. R. /Hrsg.): Methods in Molecular Biology, Vol. 71: PRINS and *In Situ* PCR Protocols, 141-161
Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA

[44] **Komminoth, P.; Long, A.A. (1994):**

Correspondence, To the editor-in-chief.
Am J Pathol. 145 (3), 742

[45] **Steel, J. H.; Morgan, D. E.; Poulson, R. (2001):**

Advantages of *In Situ* Hybridisation over direct or indirect *In Situ* Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for localisation of Galanin mRNA expression in rat small intestine and pituitary.
Histochem J. 33, 201-211

[46] **Persico, T.; Savasi, V.; Ferrazzi, E.; Oneta, M.; Semprini, A. E.; Simoni, G. (2006):**

Detection of human immunodeficiency virus-1 RNA and DNA by extractive and *in situ* PCR in unprocessed semen and seminal fractions isolated by semen-washing procedure.
Hum Reprod. 21 (6), 1525-1530

[47] **Speel, E. J.; Saremaslani, P.; Roth, J.; Hopman, A. H.; Komminoth, P. (1998):**

Improved mRNA *in situ* hybridization on formaldehyde-fixed and paraffin-embedded tissue using signal amplification with different haptenized tyramides.
Histochem Cell Biol. 110(6), 571-577

[48] **Yang, H.; Wanner, I. B.; Roper, S. D.; Chaudhari, N. (1999):**

An optimized method for *in situ* hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs.
J Histochem Cytochem. 47(4), 431-446

- [49] **Harper, S. J.; Bailey, E.; McKeen, C. M.; Stewart, A. S.; Pringle, J. H.; Feehally, J.; Brown, T. (1997):**
A comparative study of digoxigenin, 2,4-dinitrophenol and alkaline phosphatase as deoxyoligonucleotide labels in non-radioactive *in situ* hybridisation.
J Clin Pathol. 50(8), 686–690
- [50] **Bagasra, O. (2007):**
Protocols for the *in situ* PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences.
Nat Protoc. 2 (11), 2782-2795
- [51] **Deierling, M. (2006):**
Das Zytokinmilieu in den Kompartimenten der gesunden Rattenmilz: Veränderungen während einer lokalen Immunantwort.
Med. Diss., Lübeck
- [52] **Emmert-Buck, M. R.; Bonner, R. F.; Smith, P. D.; Chuaqui, R. F.; Zhuang, Z.; Goldstein, S. R.; Weiss, R. A.; Liotta, L. A. (1996):**
Laser capture microdissection.
Science. 274 (5289), 998-1001
- [53] **Clement-Ziza, M.; Munnich, A.; Lyonnet, S.; Jaubert, F.; Besmond, C. (2008):**
Stabilization of RNA during laser capture microdissection by performing experiments under argon atmosphere or using ethanol as a solvent in staining solutions.
RNA..14 (12), 2698-2704
- [54] **Livak, K. J.; Flood, S. A. J.; Marmaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K. (1995):**
Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridisation.
PCR Methods Appl. 4(6), 357–362
- [55] **Walch, A.; Specht, K.; Smida, J.; Auberle, M.; Zitzelsberger, H.; Höfler, H.; Werner, M. (2001):**
Tissue microdissection techniques in quantitative genome and gene expression analyses.
Histochem Cell Biol. 115(4), 269-276

Danksagung

Abschließend möchte ich einigen Personen Dank sagen.

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Schröder, für die freundliche Bereitstellung dieses Themas.

Ich danke Herrn Dr. Carsten Schlüter für die gute Betreuung im Labor. Ferner möchte ich den Herren Dr. Herbert Hein, Dr. Joachim Bartels und Prof. Dr. Jürgen Harder für ihre Hilfe und gute Ratschläge im Labor danken.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn Dr. Jochen Peters aus dem Institut für Pathologie für ein geduldiges Ohr und hilfreiche Empfehlungen danken.

Allen genannten gilt auch mein Dank für stets sehr freundliches und kollegiales Miteinander.

Für Geduld, aufmerksames Zuhören und ermutigende Worte, sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder Martin danken.

Lebenslauf

1968	geboren in Kingston / Ontario, Kanada
1975-89	Schulbildung in Neustadt in Holstein, 1989 Abitur
1985/86	Auslandsaufenthalt in den USA, High School
1990/91	Zivildienst in Marburg a. d. Lahn, Kinder- und Jugendpsychiatrie, Klinik Lahnhöhe
1991	Ausbildung zum Krankenpflegehelfer, Krankenhaus Alten Eichen, Hamburg, nach sechs Monaten abgebrochen
1991-94	Studium, Vorklinik in der EAU, Greifswald
1994-98	Studium, Klinik und Approbation in der CAU, Kiel; Experimenteller Teil der Dissertation Mai '96-Januar '00
1999-2000	AIP in der Inneren Abteilung, KKH Eckernförde (12 Mon.)
2000	AIP im Zentrum für Chirurgie, Städt. KH, Lübeck (6 Mon.)
2001-03	Medizinische Klinik, Marien-Hospital, Witten
seit 2003	Zentrum für Innere Medizin, Sana Kliniken OH, Eutin
2008	Facharzt für Innere Medizin
2010	Zusatzbezeichnung Intensivmedizin

Eltern:	Dr. Udo Kalbe, Kinderarzt Irene Kalbe, geb. Borchert, Lehrerin
---------	---

Geschwister:	Dr. Martin Kalbe, Biologe Maike Möhrpahl, geb. Kalbe, Krankenpflegehelferin Thilo Kalbe, Diplom-Ingenieur
--------------	---